

Despachos
de los Agentes Oficiales
de la Propiedad Industrial

Oscar de Elizaburu
Alberto de Elizaburu
Fernando de Elizaburu
Alfonso Díez de Rivera

Carlos Longo
Carlos Morán
Miguel A. Bea
Enrique Armijo
Mario de Justo
José Andrade
Juan J. Solís
Germán Burgoe
Fernando R. Tomé
J. L. Caertner
E. Tolosane
O. González
A. Cadenas

M. Oliver
R. Carretero
J. M. Alvarez
J. G. Cervera
A. Silles
J. de Justo
A. M. García
B. Larrondo
H. Möhring
L. Hdo Larramendi
J. de Pabloe
I. Arocce
A. Vila
L. Rodriguez

Consignatarios de
Julio de Viscarrondo 1883-1889
P. de Elizaburu Viscarrondo 1890-1921
Alberto de Elizaburu F. 1920-1974
(Oficina Vizcarrelza)

Patentes, Marcas, Modelos.
Licencias, Tecnología.
Estudios, Procedimientos.

Telegramas: VIZCARRELZA
Teléfono: 410 04 60
Telex: 22341 Elza E.
42931 Elza E.
Telefacsimil: 4193810

SRES. ELZABURU

Estab. 1905

NOVO INDUSTRI A/S
PATENTS & TRADE MARKS
BAGSVAERD
DINAMARCA

Su/Your ref.

2510.200-ES

N/Our ref.

P-87338

Ref.	NB/KHAA	Land
beh.	29 OKT. 1984	TT

Attn. Mr. Niels Bach

24 October 1984

Akt

Case: New Spanish Application for
Betr.: Neue spanische Anmeldung für
Réf.: Nouvelle demande espagnole pour

PATENT OF INVENTION

NO. 535602

Applicant: NOVO INDUSTRI A/S
Anmelder:
Déposant:

Inventor: PETER EIGTVED
Erfinder:
Inventeur:

Priority: DK 5 SEPTEMBER 1983
Priorität:
Priorité: 4025/83

Short title: LIPASE
Kennwort:
Titre abrégé:

Filed on: 3 SEPTEMBER 1984
Hinterlegt am:
Déposée le:

Granted on:
Erteilt am:
Accordé le:

With reference to your letter of 4.9.84, we take pleasure in sending you today the documents detailed hereunder and relating to the following formalities attended to on the quoted dates:

Unter Bezugnahme auf Ihr Schreiben vom 4.9.84, beehren wir uns, Ihnen die nachstehend erwähnten Unterlagen zu übersenden, die sich auf die zum angegebenen Zeitpunkt durchgeführten, folgenden Formalitäten beziehen:

Nous référant à votre lettre du 4.9.84, nous avons l'honneur de vous envoyer ce jour les documents mentionnés ci-dessous, correspondant aux démarches suivantes, effectuées aux dates indiquées:

Official payment voucher.
Filing receipt.
copies of the specification. + drawings
copies of the writ filed.
Final certificate.
debit note. in duplicate

amtliche Quittung.
Einreichungsbescheinigung.
Kopien der Beschreibung.
Kopien der eingereichten Schrift.
endgültige Bescheinigung.
Rechnung.

récépissé officiel.
certificat de dépôt.
copies du Mémoire.
copies de l'écrit déposé.
certificat définitif d'inscription
note de débit.

Yours very truly,

Hochachtungsvoll,

Vos dévoués,

ELZABURU

Enclosures
Anlagen
Annexes

abv

Imp. 915

BEST AVAILABLE COPY

NZAS-0033776

43

ELZABURU

BAH 84 10 29

Dirección Telegráfica
VIZCARELZA
Dirección Postal
Miguel Angel, 21
Madrid (10)

3996
NOVO INDUSTRI A/S
PATENTS & TRADE MARKS
BAGSVAERD
DINAMARCA

Su/Your ref.

2510.200-ES
NB/KHAA

Madrid

22 OCTOBER 1984

DEBIT NOTE / RECHNUNG / NOTE DE DEBIT (COPY)

Case: New Spanish Application for PATENT OF INVENTION NO. 535602
Betr.: Neue spanische Anmeldung für PATENT OF INVENTION NO. 535602
Réf.: Nouvelle demande espagnole pour PATENT OF INVENTION NO. 535602

Applicant: } NOVO INDUSTRI A/S
Anmelder: }
Déposant: }

Inventor: } PETER EIGTVED
Erfinder: }
Inventeur: }

Priority: } DK 5 SEPTEMBER 1983
Priorität: }
Priorité: } 4025/83

Short title: } LIPASE
Kennwort: }
Titre abrégé: }

Filed on: }
Hinterlegt am: }
Déposée le: } 3 SEPTEMBER 1984

FILING OF THIS APPLICATION INCLUDING THE
OFFICIAL ISSUE FEE AND FIRST TAX

459.00

TRANSLATION OF THE SPECIFICATION 6078 WORDS
AT US\$ 8.40 PER 100 WORDS

510.55

4 TYPEWRITTEN COPIES OF THE SPANISH SPECIFICATION
WITH 38 PAGES

144.40

CLAIM OF A SINGLE PRIORITY UNDER CONVENTION
CLAUSES

54.00

PREPARATION OF THE FORMAL DRAWING

9.25

US\$ 1177.20



31 NUMERO 4025/83		DATOS DE PRIORIDAD 32 FECHA 5-9-83		33 PAIS DK	A1 12 PATENTE DE INVENCION
					21 NUMERO DE SOLICITUD 535.602
					23 FECHA DE PRESENTACION 3-9-84

13 SOLICITANTE(S) NOVO Industri A/S DOMICILIO Novo Allé, 2880 Bagsvaerd, DINAMARCA			NACIONALIDAD Danesa	
17 INVENTOR(ES) Peter EIGTVED				
18 TITULAR(ES)				
11 N.º DE PUBLICACION	45 FECHA DE PUBLICACION	62 PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA	GRAFICO (SOLO PARA INTERPRETAR RESUMEN)	
53 Int. Cl.				
54 TITULO "METODO PARA PRODUCIR UNA PREPARACION DE LIPASA INMOVILIZADA DESTINADA A LA INTERESTERIFICACION DE GRASAS".				

57 RESUMEN (APORTACION VOLUNTARIA, SIN VALOR JURIDICO)

El método de producción de una preparación de lipasa inmovilizada comprende poner en contacto una disolución acuosa de una lipasa microbiana con una resina cambiadora de aniones débil, en condiciones especificadas con respecto al pH y al tiempo de contacto, tras lo cual la preparación se aísla y se seca. La preparación puede usarse para la transesterificación de grasas sin disolventes ni otros agentes auxiliares costosos.

CG/.

1 Se conocen ya las preparaciones de lipasa inmovi-
lizada para la transesterificación de grasas. Así, en la
solicitud de patente Danesa nº 563/77, que corresponde a
la patente de EE.UU. nº 4.275.081, se describe una prepara-
5 ción de lipasa inmovilizada, en la que la lipasa se produ-
ce por fermentación de especies que pertenecen a los géne-
ros Rhizopus, Geotrichum o Aspergillus, y en la que la li-
pasa se fija sobre un soporte en partículas indiferente
que puede ser tierra de infusorios o alúmina, y que mues-
tra una superficie específica muy alta (es decir partícu-
10 las de soporte pequeñas y porosas) para lograr la activi-
dad enzimática elevada necesaria. La interesterificación
puede efectuarse de modo discontinuo sin disolvente con es-
ta preparación de lipasa inmovilizada; sin embargo, con es-
15 ta preparación de lipasa inmovilizada no puede efectuarse
una interesterificación continua en una columna a escala
industrial sin la presencia de un disolvente, que ha de se-
pararse después, a causa del hecho antes indicado de que
la preparación consta de pequeñas partículas, que durante
20 el funcionamiento de la columna generaría una pérdida de
carga inaceptablemente alta. Además, una comunicación pre-
sentada en Enz. Eng. Kashikojima, Japón, 20-25 sept. 1981
y el artículo publicado en el European Journal of Applied
Microbiology and Biotechnology, nº 14, páginas 1-5 (1982)
25 indica que una preparación de lipasa inmovilizada que com-
prende lipasa de Rhizopus delemar y una resina cambiadora
de aniones fuerte (con grupos amonio cuaternarios) puede
usarse para la interesterificación con n-hexano como disol-
vente. La recuperación de enzima según estas referencias
30 es muy baja, sin embargo. Además, en la solicitud de paten-

1 te Europea publicada con el nº de publicación 0069599 se
describe una reestructuración o redistribución enzimática
de grasa, en la que se usa una lipasa de especie *Aspergi-*
llus, especie *Rhizopus*, *Mucor javanicus* o *Mucor miehei* co-
5 mo enzima de interesterificación. El enzima está soportado
sobre un soporte, por ej. Celite. En todos los ejemplos de
esta solicitud de patente Europea, referente a la interes-
terificación continua en una columna, se usa un disolven-
te.

10 Así pues, en los procedimientos de la técnica an-
terior el disolvente se usa para disminuir la viscosidad
del material graso de partida, para asegurar un funciona-
miento tan regular de la columna como sea posible. Hasta
ahora se ha considerado prácticamente imposible evitar el
15 disolvente en estos procedimientos de interesterificación
continua a escala industrial, a causa de la elevada pérdi-
da de carga en la columna, aun cuando sean evidentes las
ventajas técnicas asociadas a la eliminación de disolvente
de estos procedimientos de interesterificación.

20 En la solicitud de patente Europea publicada con
el nº 35.883 se describe que puede prepararse una prepara-
ción de lipasa inmovilizada destinada a la interesterifica-
ción de grasas poniendo en contacto una disolución acuosa
de lipasa microbiana con un soporte inerte en partículas,
25 y secado posterior. La preparación de lipasa inmovilizada
así producida puede usarse para la interesterificación de
grasas, pero sólo si las grasas se mezclan con los ésteres,
relativamente costosos, de alquilo inferior de ácidos gra-
sos, por ej. palmitato de metilo, que se usan como agentes
30 auxiliares para evitar los disolventes; de otra forma sur-

1 girían problemas de solubilidad y viscosidad.

Así, el objeto de la invención es proporcionar un método de producción de una preparación de lipasa inmovilizada que abre la posibilidad de efectuar la interesterificación continua sin disolvente ni otro agente auxiliar,
5 de un modo económicamente factible.

Ahora, sorprendentemente y según la invención, se ha encontrado que un método de producción de una preparación de lipasa inmovilizada, que se lleva a cabo muy fácilmente, a saber, por simple mezcla de una disolución acuosa de lipasa y una resina cambiadora de iones, y que comprende una combinación específica de una categoría específica de resinas cambiadoras de iones y una proporción especificada de agua en la preparación final de lipasa inmovilizada, abre la posibilidad de llevar a cabo la interesterificación continua sin disolvente ni otro agente auxiliar costoso, de un modo económicamente factible.
10 15

Así, el método según la invención para la producción de una preparación de lipasa inmovilizada destinada a la interesterificación de grasas se caracteriza por el hecho de que una disolución acuosa de lipasa microbiana se pone en contacto con una resina cambiadora de aniones débil, en partículas y macroporosa que contiene grupos amino primarios, y/o secundarios y/o terciarios, y que muestra un tamaño de partícula relativamente grande, adecuado para el funcionamiento de la columna sin una excesiva pérdida de carga, en condiciones en las que la lipasa está unida a la resina cambiadora de aniones durante un período suficiente para unir la cantidad deseada de lipasa a la resina cambiadora de aniones, tras lo cual la lipasa inmovi-
20 25 30

1 lizada así formada se separa de la fase acuosa y la lipasa
inmovilizada separada se seca hasta un contenido de agua
de entre alrededor de 2 y 40%.

5 Se describe de modo general, en las solicitudes
de patente publicadas Alemanas Nos. 2 905 671 y 2 805 950,
las solicitudes de patente Japonesa publicadas Nos.
54-76892 y 57-152886, la patente de los EE.UU. nº 4 170 696
y Chem Abs. Vol 82, 27819d, que pueden inmovilizarse enzi-
mas, incluyendo lipasas, por medio de resinas cambiadoras
10 de aniones en partículas. En primer lugar, sin embargo, no
existe ningún método universal de inmovilización adecuado
para todos los enzimas y todos los sustratos, sino que tie-
ne que idearse un método específico de inmovilización para
cualquier enzima específico y cualquier sustrato específi-
15 co, sobre el que se supone que el enzima actúa. Sin embar-
go, en segundo lugar, las lipasas son enzimas extraordina-
rios en el sentido de que la actividad enzimática actúa en
una interfase entre dos fases, lo que significa que la in-
movilización de las lipasas es un problema muy delicado,
20 que limita enormemente la utilidad de técnicas conocidas
de inmovilización en el campo que comprende la inmoviliza-
ción de lipasas; véase J. Lavayre y otros, Preparation and
Properties of Immobilized Lipases, Biotechnology and
25 Bioengineering, vol. XXIV, pp. 1007-1013 (1982), John
Wiley & Sons. En tercer lugar, la combinación de lipasa y
resina cambiadora de aniones débil macroporosa y en partí-
culas no se describe en la bibliografía indicada en el co-
mienzo de este párrafo, y menos aún que esta nueva combina-
ción dé lugar al sorprendente efecto técnico con respecto
30 a la interesterificación continua sin disolvente ni otro

1 agente auxiliar costoso.

Además, de un artículo de Yoshiharu Kimura y otros, "Application of Immobilized Lipase to Hydrolysis of Triacylglyceride" en Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. (1983) 17:107-112, se deduce que se ha usado una preparación de lipasa inmovilizada sobre una resina cambiadora de aniones para la hidrólisis de grasas. En primer lugar, la aplicación principal de la preparación de lipasa inmovilizada producida por medio del método según la invención es la interesterificación, mientras que la hidrólisis y la síntesis de grasas son aplicaciones menos importantes según la invención, que se explicarán más adelante con más detalle en esta memoria descriptiva. Y en segundo lugar, se deduce del artículo que el rendimiento de actividad es menor de 1%, véase la tabla 1 en la página 109, en comparación con un rendimiento de actividad típicamente superior a 80% en relación a la preparación de lipasa inmovilizada producida por medio del método según la invención. Esto confirma la aseveración anterior de que la inmovilización de lipasa es un problema muy delicado.

La expresión "tamaño medio de partícula relativamente grande" se usa con la intención de referirse al tamaño medio de partícula del producto que se describe en la solicitud de patente Danesa nº 563/77, y del que la mayoría de las partículas tienen un tamaño de partícula menor de alrededor de 50 micras. Se ha encontrado que la temperatura no tiene un gran efecto en el rendimiento de la actividad, ya que se ha mostrado experimentalmente que el rendimiento de actividad es virtualmente independiente de la temperatura, en el caso en que la temperatura durante la

1 inmovilización se mantenga entre 5 y 35°C.

Para no desactivar el enzima, las interesterificaciones de la técnica anterior se efectúan a temperatura relativamente baja. Esto se hace posible por la presencia
5 del disolvente, que es capaz de disolver la grasa, que podría tener un punto de fusión relativamente alto. Se ha encontrado, sorprendentemente, que la preparación de lipasa inmovilizada producida por el método según la invención tiene una estabilidad suficiente en la grasa fundida a una
10 temperatura relativamente más alta. Además, la pérdida de carga a través de la columna de interesterificación cargada con la preparación de lipasa inmovilizada producida por el método según la invención, es suficientemente baja para permitir un funcionamiento uniforme. Asimismo, y sorprendentemente, se ha encontrado que la combinación única de
15 condiciones de contacto, resina cambiadora de iones y contenido de agua genera una elevada actividad específica de lipasa en la mezcla de grasas fundidas, contrariamente a todos los intentos anteriores para proporcionar una preparación de lipasa inmovilizada destinada al uso sin disolvente. Además, mientras que los procedimientos de la técnica
20 anterior de la clase descrita en la solicitud de patente Danesa nº 563/77 han requerido una lipasa purificada para dar una preparación utilizable de lipasa, se ha encontrado sorprendentemente que la preparación de lipasa inmovilizada según la invención puede prepararse con base en un producto de lipasa más bien bruto. Además, mientras que la preparación de los procedimientos de la técnica anterior de la clase descrita en la solicitud de patente Danesa nº
25 563/77 han implicado el uso de un disolvente orgánico para
30

1 depositar la lipasa sobre el soporte, no se necesita tal
disolvente orgánico para la obtención de la preparación de
lipasa inmovilizada según la invención, que puede prepararse
se muy fácilmente sólo mezclando soporte y una disolución
5 de lipasa acuosa. Además, mientras que la actividad de lipasa se elimina fácilmente por lavado o de otro modo de la preparación de la técnica anterior de la clase descrita en la solicitud de patente Danesa nº 563/77, se ha encontrado que la lipasa en la preparación de lipasa inmovilizada pro
10 ducida por el método según la invención es prácticamente imposible de separar de la preparación, si no se somete a tratamientos químicos o físicos adversos, por ejemplo a condiciones adversas de pH y temperatura. Finalmente, se ha encontrado que la preparación de lipasa inmovilizada produ
15 cida por el método según la invención puede prepararse con una elevada recuperación de enzima que abre la posibilidad de una interesterificación continua más barata que las interesterificaciones de la técnica anterior.

En una realización preferida del método según la
20 invención, la lipasa es una lipasa termoestable. Con ello es posible una temperatura superior de interesterificación, y por lo tanto una mayor productividad. Además, por medio de esta realización es posible producir una preparación de lipasa inmovilizada que es muy adecuada para la interesterificación de grasas de punto de fusión más elevado.
25

En una realización preferida del método según la invención, la lipasa microbiana se deriva de una especie termofílica de Mucor, especialmente Mucor miehei. El Mucor miehei es un buen productor de lipasa 1,3-específica, y
30 por lo tanto puede obtenerse un buen producto.

1

En una realización preferida del método según la invención, más del 90% de las partículas de la resina cambiadora de aniones débil macroporosa tiene un tamaño de partícula de entre aproximadamente 100 y 1000 micras, y preferiblemente entre 200 y 400 micras. En este intervalo de tamaño de partículas se obtiene un buen compromiso entre una alta actividad de interesterificación y baja pérdida de carga.

5

10

En una realización preferida del método según la invención, la proporción entre la cantidad de la disolución acuosa de lipasa microbiana y el peso de resina cambiadora de aniones débil corresponde a 5.000-50.000 LU/g de resina cambiadora de aniones (peso en seco). De este modo se proporciona suficiente lipasa para la resina cambiadora de aniones.

15

20

En una realización preferida del método según la invención, la lipasa microbiana se deriva de una especie de *Mucor termofílica*, especialmente *Mucor miehei*, y el pH durante el contacto entre la resina cambiadora de iones y la disolución acuosa está entre 5 y 7. De este modo se asegura una buena unión entre la lipasa y la resina de cambio de iones, así como una buena estabilidad y actividad.

25

En una realización preferida del método según la invención, el tiempo de contacto está entre 0,5 y 8 horas. De este modo se obtiene un estado de saturación con lipasa, o una aproximación al mismo.

30

En una realización preferida del método según la invención, la separación se efectúa por simple filtración. Este procedimiento es simple y muy adaptable a la práctica industrial.

1 En una realización preferida del método según la
invención, el secado se efectúa hasta un contenido de agua
de entre alrededor de 5 y 20% de agua. La operación de se-
cado puede efectuarse en vacío, en lecho fluido o por
5 otros medios de secado adecuados para una operación a gran
escala. De este modo se obtiene una preparación final de
lipasa con una elevada actividad de interesterificación.

10 En una realización preferida del método según la
invención, la resina cambiadora de aniones débil, en partí-
culas y macroporosa se pone en contacto con una disolución
acuosa de agente de reticulación, preferiblemente una diso-
lución acuosa de glutaraldehído, en una concentración en-
tre 0,1 y 1,0 en peso/peso, antes, durante o después del
15 contacto entre la resina cambiadora de aniones débil, en
partículas y macroporosa y la disolución acuosa de lipasa
microbiana, tras lo cual se separa la disolución que queda
de agente de reticulación. Incluso si se observa una peque-
ña reducción de actividad de enzima a causa del agente de
reticulación, se ha encontrado que tal tratamiento puede
20 elevar la estabilidad de la preparación de lipasa en medios
acuosos para una aplicación específica. En relación con el
uso de la preparación de lipasa inmovilizada como agente
de interesterificación, no hay necesidad de mejora alguna
de la estabilidad de la preparación de lipasa, ya que esta
25 estabilidad es excelente por sí misma en la preparación de
lipasa producida según la invención para esta aplicación.
Sin embargo, se ha encontrado que la preparación de lipasa
inmovilizada producida por el método según la invención
puede usarse también ventajosamente para la hidrólisis de
30 grasa, y para esta aplicación, una mejora de la estabilidad

1 de la preparación de lipasa es un desideratum, debido pro-
bablemente a la combinación de una concentración relativa-
mente alta de agua y altas temperaturas en la mezcla de re
acción, necesaria para un proceso de hidrólisis de grasas
5 efectuado industrialmente.

Además, la invención comprende el uso de la pre-
paración de lipasa inmovilizada producida por el método se
gún la invención, que es un método de interesterificación
de grasas, en el que unas grasas fundidas, mezcladas facul
10 tativamente con ácido graso libre disuelto, se ponen en
contacto con la preparación de lipasa inmovilizada produci
da por el método según la invención, sin ningún disolvente
ni otro agente auxiliar costoso, o sustancialmente sin nin
gún disolvente ni otro agente auxiliar costoso. Los ácidos
15 grasos libres, con los que las grasas pueden mezclarse fa-
cultativamente según la invención, no deben considerarse
como agentes auxiliares costosos. "Grasas" quiere decir o
bien un triglicérido puro o una mezcla de triglicéridos de
una o más fuentes.

20 Además, la invención comprende otro uso de la
preparación de lipasa inmovilizada producida por el método
según la invención, que es un método de hidrólisis de gra-
sas, en el que una emulsión de triglicérido y agua se pone
en contacto con la preparación de lipasa inmovilizada pro-
ducida según la invención, sin ningún disolvente ni otro
25 agente auxiliar costoso, o sustancialmente sin ningún di-
solvente ni otro agente auxiliar costoso.

La invención comprende también otro uso de la
preparación de lipasa inmovilizada producida por el método
30 según la invención, que es un método de síntesis de grasas

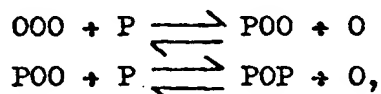
1 en el que una mezcla de glicerina y ácidos grasos libres
se pone en contacto con la preparación de lipasa inmovili-
zada producida según la invención, sin ningún disolvente
ni otro agente auxiliar costoso, o sustancialmente sin nin-
5 gún disolvente ni otro agente auxiliar costoso.

La invención se ilustrará por medio de los ejem-
plos siguientes.

La lipasa de Mucor miehei usada en los ejemplos
que siguen puede obtenerse en NOVO Industri A/S, Novo Alle,
10 2880 Bagsvaerd, Dinamarca, a petición (como producto de so-
licitud de enzima SP 225). Esta lipasa de Mucor Miehei pue-
de obtenerse como se indica en la patente Danesa nº
4234/77.

La unidad de actividad de lipasa (LU) indicada
15 en los ejemplos se determina como se describe en la publi-
cación AP 95.1/2-GB de 3.1.83, obtenible de NOVO Industri
A/S, Novo Alle, 2880 Bagsvaerd, Dinamarca.

La actividad de interesterificación de las prepa-
raciones de lipasa inmovilizada se determina por medio de
20 una determinación discontinua basada en las reacciones si-
guientes:



donde O = ácido oleico, P = ácido palmítico, y 000, P00 y
25 POP son grasas que contienen los ácidos grasos indicados
en el orden que se indica, siendo 000 por tanto trioleína.

250 mg de preparación de lipasa inmovilizada se
mezclan con 600 mg de trioleína (0,68 mmoles) y 174 mg de
ácido palmítico (0,68 mmoles) disueltos en 12 ml de white
30 spirit (temp. 80-100°C) en un tubo de vidrio de 20 ml con

1 tapón de rosca. Los tubos se incuban en un baño de agua a 40°C y se agitan durante 1/2, 1 ó 3 horas.

5 La mezcla de reacción se enfría, se filtra y se evapora. La cantidad relativa de OOO, POO y POP se determina por HPLC (cromatografía de líquidos de alto rendimiento, abrev. del inglés "High performance liquid cromatography"), y el tanto por ciento de P incorporado se calcula como

10
$$\% \text{ de P incorporado} = \frac{\% \text{ de POO} + 2 \times \% \text{ de POP}}{3}$$

La composición de equilibrio de la mezcla de reacción discontinua antes indicada es aproximadamente 43% de POO y 10% de POP, o sea 21% de P incorporado.

15 En algunos de los ejemplos siguientes, la interesterificación se efectúa en forma de operación discontinua con o sin disolvente. Se ha establecido por medio de ensayos comparativos que una preparación de lipasa inmovilizada, que tiene una actividad y estabilidad de interesterificación satisfactorias, demostradas por el ensayo de interesterificación discontinuo, y que tiene una distribución de tamaños de partículas y una resistencia física adecuada para un funcionamiento de la columna, funcionará satisfactoriamente por operación continua también en columna, con o sin disolvente. Así, un ensayo discontinuo satisfactorio en estas circunstancias es una evidencia de que
20 puede efectuarse un ensayo en columna continuo satisfactorio con la preparación de lipasa inmovilizada en cuestión.
25 Ejemplo 1.

30 Este ejemplo ilustra el efecto del pH durante la adsorción de lipasa de *Mucor miehei* en la actividad de in-

1 teresterificación.

2,0 gramos de lipasa de Mucor Miehei, 93.000 LU/g, se disolvieron en 20 ml de agua, y se pusieron en suspensión en ellos 10 gramos de Duolite ES 562 lavada con
5 agua como resina cambiadora de aniones, de peso en seco 8,5 g.

Se ajustó el pH de tres de tales porciones a 5,0, 6,0 y 7,0, respectivamente, y se mantuvieron en agita
ción con agitador magnético durante 4 horas a unos 5°C.

10 Las tres porciones se filtraron. Después de la filtración, la cantidad de actividad hidrolítica (LU) en los tres filtrados (antes del lavado) estaba entre 10 y 17% de las cantidades totales iniciales (186.000 LU). Des
pués se efectuó un lavado con agua con una pequeña canti
15 dad de agua, y después las preparaciones se secaron duran
te la noche a vacío a temperatura ambiente.

Los resultados se resumen en la tabla que sigue.

20	pH de inmovilización	Producción g	Contenido de agua %	Actividad de inter esterificación, 30 minutos		
				% de POO	% de POP	% de P incor porado
	5,0	9,20	9,5	24,5	6,2	12,3
25	6,0	9,56	8,2	26,5	6,6	13,2
	7,0	9,41	8,0	21,2	5,2	10,5

Ejemplo 2.

30 Tres porciones de 10 g de resina cambiadora de iones húmeda, Duolite ES 562 (peso en seco 8,35 g) se pusie

1 ron en suspensión en 50 ml de agua, y se añadió NaOH 4 N hasta que el pH se estabilizó a 6,0. Después se lavaron con gran cantidad de agua y se escurrieron en un embudo Buchner, dando un peso escurrido de unos 16 g.

5 A cada una de dos de las porciones de 10 g se le añadió una disolución de 2,5 g de lipasa de *Mucor Miehei* (actividad 93.000 LU/g) en 25 ml de agua, y el pH se ajustó a 6,0.

10 A la tercera porción se le añadió una porción de 2,5 g de la lipasa de *Mucor Miehei* antes indicada en 50 ml de agua, y el pH se ajustó a 6,0.

La mezcla se agitó lentamente a temperatura ambiente (25°C) durante 2 horas. Después, el líquido se separó por filtración en un embudo Buchner.

15 Una de las porciones con 25 ml de disolución de lipasa se lavó además con 2 x 25 ml de agua. Las preparaciones inmovilizadas se secaron en vacío.

20 Para el ensayo de interesterificación, 250 mg (peso en seco) de las preparaciones de enzima inmovilizadas se humedecieron con 20 microlitros de agua antes de la mezcla con el sustrato.

Interesterificación, 1/2 hora

Preparación de lipasa inmovilizada con	% de P incorporado		
	% de P00	% de POP	% de P incorporado
25 2,5 g de lipasa en 25 ml sin lavado	25,8	6,85	13,2
2,5 g de lipasa en 25 ml con lavado	30,1	7,65	15,1
30 2,5 g de lipasa en 50 ml sin lavado	26,8	6,86	13,5

1 Este ejemplo demuestra que un lavado posterior
con agua para separar la lipasa no ligada es esencial para
obtener una elevada actividad de interesterificación, mien
tras que la cantidad de agua en la que se disuelve la lipa
5 sa durante la inmovilización es de pequeña importancia.

Ejemplo 3.

50 g de resina cambiadora de iones húmeda Duolite ES 562 (peso en seco, 41,8 g) se ajustó a pH 6,0 y se lavaron como en el ejemplo 2.

10 Se mezclaron porciones de 10,6 g de esta resina cambiadora de iones húmeda (unos 5 g de peso en seco) con cantidades diferentes de una disolución al 10% de lipasa de Mucor miehei (81.000 LU/g) según la tabla.

15 Después de la reacción, el líquido se separó por filtración en un embudo Buchner, y la preparación de lipasa se lavó con 2 x 25 ml de agua y se secó en vacío a alrededor de 97% de materia seca.

20 Las muestras de 250 mg de peso en seco de preparación inmovilizada con fines de ensayo se humedecieron con 20 microlitros de agua antes de la determinación.

25

30

1	g de resina cambiadora de iones húmeda	g de disolu- ción de lí- pasa al 10%	Tiempo de re- acción, ho- ras a tempe- ratura am- biente	Interesterificación, 1/2 hora		
				% de POO	% de POP	% de P incor- porado
5	10,6	12,5	1	26,5	6,62	13,3
	10,6	12,5	2	27,0	6,62	13,4
	10,6	12,5	4	28,2	7,27	14,3
	10,6	25	1	23,5	5,90	11,8
	10,6	25	2	29,7	7,56	14,9
10	10,6	25	4	31,4	7,99	15,8
	10,6	50	1	19,5	4,34	9,4
	10,6	50	4	26,6	6,73	13,4

Este ejemplo muestra que la dosificación óptima de lipasa depende del tiempo de reacción.

Ejemplo 4.

Dos de las preparaciones del ejemplo 3 se ensayaron de nuevo variando la adición de agua, es decir la muestra con 12,5 g de disolución de lipasa y la de 25 g de disolución de lipasa, ambas con un tiempo de reacción de 2 horas. El efecto del contenido de humedad en la actividad de interesterificación se muestra en la tabla siguiente.

1

Muestra	Microlitros de agua añ dida a 250 mg de peso seco	Humedad estimada en la muestra	Interesterificación, 1/2 hora		
			% de P ₀₀	% de P _{0P}	% de P _{in} corporado
5 12,5 g	0	2,6	18,2	2,27	7,6
	20	9,6	25,6	6,55	12,9
	50	18,5	23,4	5,85	11,7
	100	29,9	15,3	3,84	7,6
10 25 g	0	3,0	19,1	2,04	7,7
	20	10,0	28,6	7,65	14,6
	50	18,8	25,4	5,25	12,0
	100	30,1	18,6	4,55	9,2

15

Este ejemplo muestra que el contenido de humedad
óptimo es alrededor de 10%.

Ejemplo 5.

20

Una de las preparaciones del ejemplo 3 se ensayó
de nuevo con cantidades variables de agua adicional. Se
usó la muestra con 25 g de disolución de lipasa y 4 horas
de tiempo de reacción.

25

	ul de agua añ dida a 233 mg de peso en seco	Agua estima da en la muestra, %	Interesterificación, 1/2 hora		
			% P ₀₀	% P _{0P}	% P incorporado
30 150	0	9,5	28,0	6,57	13,7
	10	13,1	28,9	7,45	14,6
	20	16,2	27,9	6,46	13,6
	30	19,1	26,6	6,96	13,5
	40	21,8	25,0	6,77	12,8
	50	24,4	22,8	5,20	11,1
	75	30,0	19,6	4,54	9,6
	100	34,9	14,6	3,88	7,5
	150	42,9	0,44	0	0,1

29094

1 Ejemplo 6.

22,8 g de resina cambiadora de iones húmeda Duolite A 561 (88,2% de sustancia seca) se ajustaron a pH 6,0 y se lavaron.

5 Otra muestra de 22,8 g de Duolite A 561 se trituró parcialmente en un mortero antes del ajuste de pH y el lavado.

A cada una de estas porciones se le añadió una disolución de 10 g de lipasa de Mucor miehei (93.000 LU/g) en 200 g de agua con pH ajustado a 6. La reacción tuvo lugar en 2 horas a temperatura ambiente.

Los enzimas inmovilizados se lavaron con 1 litro de agua y se secaron en vacío.

15 Después del secado, la muestra no triturada se trituró en un mortero, y ambas muestras se tamizaron.

Interesterificación, 1/2 hora

Fracción, (tamiz)	Trituración antes de la inmovilización			Trituración después de la inmovilización		
	% de P00	% de POP	% de P incorp.	% de P00	% de POP	% de P incorp.
180-300 micras	30,1	7,78	15,2	25,7	6,39	12,8
425-500 micras	25,7	6,66	13,0	21,7	5,50	10,9
600-710 micras	19,2	5,06	9,8	17,2	4,38	8,7
850-1000 micras	12,7	3,22	6,4	14,3	3,90	7,4

25

Se ve claramente que es ventajoso usar las fracciones granulométricas finas para obtener una máxima actividad de interesterificación, pero la necesidad de una baja pérdida de carga hace necesario un compromiso.

30

1 Ejemplo 7.

Este ejemplo ilustra el efecto de clases diferentes de resinas de cambio de aniones débiles macroporosas (tipo de matriz, grupos funcionales, tamaño de partícula) en la actividad de interesterificación discontinua de la preparación de lipasa inmovilizada.

5 En el caso de Duolite ES 562, Duolite A 561, Duolite A 7, Amberlite IRA 93, y Amberlyst A 21, 4,25 gramos de peso en seco de resina se lavaron con agua, se mezclaron con 1 g de lipasa de Mucor miehei (93.000 LU/g), en 20 ml de agua, ajustándose el pH de la mezcla a 6,0, y haciéndose girar lentamente durante 2 horas a temperatura ambiente. Después de filtrar, cada preparación se lavó con 250 ml de agua. En el caso de la Duolite A 378, se mezclaron 15 8,5 gramos con 2 gramos de lipasa y finalmente se lavaron con 250 ml de agua. Todas se secaron en vacío a temperatura ambiente. En el caso de la Duolite A 365, Duolite S 587 y Dowex MWA-1, 4,25 gramos de peso en seco de resina se mezclaron con 1 gramo de lipasa de Mucor miehei (124.000 20 LU/g) en unos 10 ml de agua durante 2 horas, por rotación a temperatura ambiente (sin embargo, en el caso de Lewatit se usaron 0,5 g de lipasa). Después de filtración y lavado con 2 volúmenes de agua, las preparaciones se secaron en vacío a temperatura ambiente. La caracterización de las 25 preparaciones inmovilizadas se muestra en la tabla que sigue.

30

29094

Resina cambiadora de aniones	Matriz	Grupos func.	Tamaños de partíc., μm ($>85\%$)	Agua %	Actividad en discontinuo, 1/2 hora		
					% POC	% POP	% de P incorr
Duolite ES 562	Fenol-formaldehido	Amina terc.	212 - 425	13,8	26,7	6,8	13,4
Duolite A 561	Fenol-formaldehido	Amina terc.	300 - 1200	13,0	14,8	3,2	7,1
Duolite A 7	Fenol-formaldehido	Amina sec.	300 - 1200	13,5	9,5	2,5	4,8
Duolite A 378	Poliestirénica	Amina terc.	300 - 1100	6,3 [±]	14,3	3,3	7,0
Amberlite IRA 93	Estireno-DVB	Poli-amina	400 - 500	12,2	10,8	2,9	5,5
Amberlyst A 21	Estireno-DVB	Amina terc.	425 - 850	11,1	10,6	2,7	5,3
Duolite A 365	Poliestirénica	Amina prim.	300 - 1200	11,5	15,5	3,7	7,6
Duolite S 587	Fenol-form.	Aminas	300 - 1100	7,4	25,4	6,4	12,7
Lewatit MP 62	Poliestirénica	Aminas	300 - 1200	13,6	16,9	3,9	8,2
DOWEX MWA-1	Estireno-DVB	Amina terc.	300 - 1200	10,5	21,0	4,9	10,3

± Se añadió 5% de agua antes del ensayo discontinuo

Ejemplo 8.

30 g de resina cambiadora de iones Duolite de tipo ES 562 se pusieron en suspensión en unos 75 ml de agua, y el pH se ajustó a 6,0 con NaOH 4 N. La resina cambiadora de iones se lavó con agua sobre un filtro de succión, y el exceso de agua se separó por succión. La resina cambiadora de iones húmeda (unos 45 g) se dividió en tres porciones iguales.

1 La primera porción se mezcló con una disolución
de 1 g de lipasa de *Mucor miehei* (210.000 LU/g) en 20 ml
de agua con pH ajustado a 6,0. Después de la mezcla, el pH
se ajustó de nuevo a 6,0, y la mezcla se dejó reaccionar
5 durante 4 horas a 5°C con agitación magnética. Durante es-
te período, el pH descendió a 5,45. La mezcla se transfi-
rió a un embudo Buchner con unos pocos mililitros de agua,
y se separó por succión toda la cantidad posible de disolu-
ción (14 ml). La resina se secó además en vacío hasta un
10 contenido de agua de 10,0%. Producción 8,27 g.

La segunda porción de la resina húmeda se mezcló
con una disolución de 1 g. de la lipasa antes indicada en
20 ml de tampón de acetato de sodio 0,1 M (pH 6,0). El pH
de la mezcla se ajustó de nuevo a 6,0 y la mezcla se dejó
15 reaccionar durante 4 horas a 5°C con agitación magnética.
Durante este período, el pH descendió a 5,83. El procedi-
miento se continuó como se ha indicado en relación con la
primera porción de la resina cambiadora de iones húmeda,
dando lugar a 21 ml de filtrado y 9,10 g de preparación se-
ca con un contenido de humedad de 9,5%.

20 La tercera porción de la resina se mezcló con di-
solución de lipasa como antes, pero el pH se mantuvo cons-
tante en 6,0 durante el período de copulación de 4 horas a
5°C, por adición de 0,58 ml de NaOH 1 N. La mezcla se tra-
25 tó como las otras porciones, dando lugar a 28 ml de filtra-
do y 8,95 g de preparación seca con 8,9% de humedad. Los
tres filtrados contenían entre el 1 y el 5% de la activi-
dad total inicial.

30 La actividad de interesterificación con 250 mg
de preparación de lipasa inmovilizada, después de un tiempo

1 de reacción de 30 minutos a 40°C, se indica en la tabla que sigue.

Preparación de enzima inmovilizada en	Actividad de interesterificación, 1/2 hora		
	% de POO	% de POF	% de P incorporado
Agua desmineralizada, pH 6	27,4	6,6	13,5
Acetato 0,1 M, pH 6	25,4	6,5	12,8
10 Agua desmineralizada con pH estabilizado a 6	27,7	7,0	13,9

Se ve en la tabla que sólo hay ligeras diferencias entre las preparaciones.

Ejemplo 9.

15 Este ejemplo ilustra los efectos de la presencia de dos sales en el intervalo de concentración de 0-0,5 M durante la inmovilización de la actividad de interesterificación.

20 Cinco porciones de 1,00 gramo de lipasa de *Mucor miehei*, diafiltradas, y secadas por congelación, con una actividad de 93.000 LU/g, se disolvieron en 20 ml de:

- 1) agua desmineralizada
- 2) fosfato de sodio 0,05 M, pH 6,0
- 3) Id. id. 0,5 M, pH 6,0
- 25 4) cloruro id. 0,05 M
- 5) Id. id. 0,5 M

30 Otras cinco porciones de 5,25 gramos (peso en seco 4,25 g) de resina cambiadora de iones Duolite ES 562 se equilibraron con 20 ml de 1) a 5) anteriores. Después de decantar, las disoluciones de lipasa correspondientes se

- 1 añadieron a las partículas de resina cambiadora de iones húmeda ajustada a pH 6,0, y los recipientes se hicieron girar lentamente durante 2 horas a 25°C. Las preparaciones se recogieron después por filtración, y cada una de ellas se lavó con 250 ml de agua desmineralizada, y se secó después en vacío a 25°C (64 horas). Los resultados de la determinación de la actividad de interesterificación se muestran a continuación:

Sal/concentración	Producción, g	Actividad de interesterificación, 1/2 hora	Actividad de interesterificación, 1/2 hora			
			% H ₂ O [±]	% POO	% POP	% de P incorporado
Ninguna sal	4,51	4,7	23,1	5,7		11,5
Fosfato 0,05 M	4,48	5,3	21,9	5,3		10,8
" 0,5 M	4,57	4,6	20,3	5,1		10,2
NaCl 0,05 M	4,54	4,6	23,4	5,7		11,6
" 0,5 M	4,43	4,9	19,2	4,6		9,5

± Se añadió H₂O hasta un total de 10% antes del ensayo.

Ejemplo 10.

- 20 Este ejemplo muestra los efectos de altas concentraciones de acetato de sodio durante la inmovilización de lipasa en la actividad de interesterificación de las preparaciones.

- 25 Cinco porciones de 1,00 g de lipasa de *Mucor miehei*, diafiltradas y secadas por congelación, de 93.000 LU/g, se disolvieron por separado en 20 ml de los líquidos siguientes:

- 30
- 1) agua desmineralizada
 - 2) acetato de sodio 0,5 M, pH 6,0
 - 3) Id. id. 1,0 M, pH 6,0

1

4) acetato de sodio 2,0 M, pH 6,0

5) Id. id. 4,0 M, pH 6,0.

5

10

15

Cinco porciones de 4,25 g (peso en seco) de resina cambiadora de iones Duolite ES 562 se lavaron y se equilibraron mezclándolas con las cinco disoluciones antes indicadas, 1) a 5), y después se agitaron durante 15 minutos. Se mezclaron las disoluciones de lipasa y las resinas cambiadoras de iones lavadas correspondientes, se ajustó el pH a 6,0 y se hicieron girar lentamente durante 2 horas a temperatura ambiente. Cada preparación se filtró, se lavó con 250 ml de agua y se secó en vacío a temperatura ambiente. Se determinó la actividad de interesterificación discontinua de las preparaciones, mostrándose los resultados en la tabla siguiente.

20

Conc. de acetato (M)	Producción después del secado (g)	Agua después del secado (%)	Filtrado pH	Act. (%) [±]	Actividad de interesterificación discontinua, 1/2 hora		
					% de P ₀₀	% de P _{0P}	% de P in corporado
0	4,81	7,8	5,2	51	22,2	5,7	11,2
0,5	4,67	8,0	5,8	64	20,1	4,7	9,8
1,0	4,72	9,6	5,8	71	18,8	4,3	9,1
2,0	4,73	9,1	5,8	55	27,9	7,3	14,2
4,0	4,75	10,4	5,6	69	19,8	4,7	9,7

25

[±] Actividad en tanto por ciento de la cantidad total inicial (93.000 LU)

Ejemplo 11.

30

Este ejemplo ilustra la inmovilización de lipasas microbianas distintas de la lipasa de *Mucor miehei*:

1 Se inmovilizó lipasa de *Fusarium oxysporum*, pre-
parada como se describe en la solicitud de patente Danesa
nº 2999/84, Ejemplo 23, mezclando 6,72 g de lipasa de
5 88.000 LU/g y 4,25 g de materia seca de resina cambiadora
de iones Duolite ES 562, lavada y de pH ajustado, en 25 ml
de agua a pH 6,0, y por rotación a temperatura ambiente du-
rante 2 horas. Después se efectuó el lavado con 2 x 25 ml
de agua, y secando en vacío se obtuvieron 4,93 g de prepa-
ración con un contenido de agua de 8,1%.

10 La actividad que quedó en el filtrado total co-
rrespondía a 18% de la actividad original.

 Se obtuvo estearasa de *Aspergillus niger* por ul-
trafiltración del producto comercial Palatase de NOVO. 15
ml de PALATASE de 2790 LU/ml se inmovilizaron sobre 4,25 g
15 de ES 562 como se ha descrito antes, con lo que se obtuvie-
ron 4,77 g de preparación inmovilizada con 7,6% de agua.
El filtrado contenía 13% de la actividad (LU) original.

 Se inmovilizó de modo similar lipasa de *Candida*
cylindracea, de Amano (tipo OF) mezclando 4,25 g de ES 562
20 con 1,40 g de lipasa Amano OF en 15 ml de agua de pH 6,0.
La producción fue de 4,62 g de preparación inmovilizada
con 6,5% de agua y quedando 0,2% de la actividad en el fil-
trado.

25 Las tres preparaciones se caracterizaron como si-
gue:

- 1) Por la determinación o ensayo discontinuo es-
tándar a 40°C.
- 2) Por interesterificación discontinua de tric-
leína (OOO)/ácido decanoico (D) sin disolven-
30 te a 60°C, usando 3,0 g de OOO, 0,600 g de D

1 y 250 mg de preparación de lipasa seca hidra-
tada a alrededor de 10% de agua.

Con fines de comparación, también se indican los
resultados de una preparación de lipasa de *Mucor miehei*,
5 como la descrita en el ejemplo 13:

	Lipasa inmo- vilizada	Carga estim. LU/mg	000/P/disolvente, 40°		000/D, 60°	
			Tiempo (h)	%P inc.	Tiempo (h)	%D inc.
10	<i>Fusarium oxysporum</i>	11	3	8,0	17	5,9
	<i>Aspergillus niger</i>	8	3	4,4	17	6,5
	<i>Candida cylindracea</i>	30	3	8,9	17	1,9
15	<i>Mucor miehei</i>	30	0,5	14,7	2	13,2

Para lograr una mejor comprensión de los ejem-
plos anteriores, se hace referencia a la tabla siguiente.

Estos ejemplos ilustran la influencia de los fac-
tores que se indican en la actividad de interesterifica-
ción de las preparaciones de lipasa inmovilizada prepara-
das por el método según la invención.

Ejemplo Nº Factor que se estudia

1, 8	pH
2	Lavado posterior
3	Carga de lipasa en relación con el tiempo de reacción
4, 5	tanto por ciento de agua
6	tamaño de partículas
7	tipo de resina
8-10	fuerza iónica en la disolución de lipasa
11	microorganismo fuente de lipasa

1 Para demostrar la utilidad de la preparación de
lipasa inmovilizada preparada por el método según la inven-
ción, se usó una preparación de lipasa inmovilizada produ-
cida por el método según la invención, como se indica más
5 adelante, en una interesterificación continua de grasas
sin uso de disolvente ninguno ni otros agentes auxiliares
costosos, como se describe en el ejemplo 12 que sigue.

Ejemplo 12.

10 Este ejemplo ilustra la interesterificación con-
tinua de grasas sin disolvente ni otros agentes auxiliares
costosos, usando una preparación de lipasa inmovilizada
producida por el método según la invención, en un reactor
de lecho relleno.

Inmovilización

15 2,20 gramos de lipasa de Mucor miehei (81.000
IU/g) se disolvieron en 20 ml de agua, se mezclaron con 10
gramos de resina cambiadora de iones Duolite ES 562, lava-
da (8,5 g de peso en seco), siendo más del 80% de las par-
tículas de entre 200 y 400 micras. El pH de la mezcla se
20 ajustó a 5,0, y se dejó ésta 4 horas a 5°C con agitación
magnética. Después de filtrarla y lavarla con una pequeña
cantidad de agua, la preparación se secó en vacío a tempe-
ratura ambiente. La producción fue de 9,05 gramos, que con-
tenían 9,3% de agua. La actividad que quedó en el filtrado
25 era de 8% de la cantidad inicial total. La actividad de in-
teresterificación discontinua era de 30,6% de POO, 7,7% de
POP a la media hora, ó 15,3 de P incorporado..

Ensayo en columna

30 2 gramos de esta preparación de lipasa inmovili-
zada se colocaron en una columna, y se hizo pasar continua

1 mente a 60°C un sustrato exento de disolvente que constaba de aceite de oliva/ácido palmítico en la proporción de 2,5:1 en peso/peso. El rendimiento de la preparación de li pasa se muestra en la tabla que sigue.

5

Muestra/tiempo	Caudal, gTG/h/g de enzima	Composición (HPLC)			Conversión x, % (GLC)
		% de 000	% de P00	% de POP	
Aceite de oli- va/iniciación	-	42,3	22,5	3,8	0
10 17 horas	5,7	30,5	30,1	11,6	-
208 1/2 hora	2,5	33,8	28,8	8,6	28
233 "	0,61	22,2	34,8	16,5	67
475 "	1,8	35,1	28,8	8,7	28
15 Equilibrio (discontinuo)	-	17,4	36,0	20,6	100

Leyenda: TG = triglicéridos; g enz. = gramos de lipasa in-
movilizada.

El % de P incorporado se determina por GLC de és-
teres de metilo de ácidos grasos.

20 Conversión $x = (\% \text{ de } P - \% \text{ de } P_0) / (\% \text{ de } P_{eq} - \% \text{ de } P_0)$.
 P_0 y P_{eq} son % de P incorporado en el sustrato de aceite
de oliva (P_0) y en la mezcla de TG en el equilibrio (P_{eq}).

Comentarios

25 Con base en los datos de 208 1/2 y 475 horas, la
extrapolación a la iniciación en gráfico semilogarítmico
indica una actividad inicial (caudal) de 3,2 g de TG/h/g.
de enzima con un grado de conversión correspondiente $x =$
28%. Una estimación de la vida media (semiperíodo) es de
30 500-600 horas a 60°C sin disolvente y aceite de oliva/P =

1 2,5:1 (peso/peso). No se han observado problemas de pérdi-
da de carga. Un intento anterior de hacer pasar un sustra-
to similar a través de lipasa adsorbida sobre Celite, de
la clase descrita en la solicitud de patente Danesa nº
5 563/77 en una columna, fue imposible de efectuar.

Ejemplo 13.

Este ejemplo ilustra una producción a escala de
instalación piloto de una preparación de lipasa inmoviliza
da en una columna, y la aplicación de esta preparación a
10 una interesterificación continua en una columna con sustra-
to a 60 y a 70°C, sin disolvente.

Inmovilización.

6,0 kg (81% de materia seca) de resina cambiado-
ra de iones Duolite ES 562 se acondicionaron según las ins
15 trucciones del fabricante (Información Técnica Duolite
OlloA). Esto implica un ciclo ácido-base y en este caso
también un lavado con etanol (para asegurar la máxima pure-
za en el tratamiento de alimentos). El pH se ajustó a 6,0
en tampón de fosfato 0,1 M. La suspensión se introdujo en
20 una columna y la resina estabilizada (18 l) se lavó con 72
l de agua.

18 l de lipasa de Mucor miehei (10.100 LU/ml)
con pH ajustado a 6,0 se recircularon a 30 l/h durante 6
horas con control de pH. Después de un desplazamiento con
25 20 l de agua, un volumen combinado de 37 l contenía 126
LU/ml, que corresponden a un rendimiento de inmovilización
de 97%. La columna se lavó además con otros 20 l de agua y
la preparación se secó a vacío a temperatura ambiente, con
lo que se obtuvieron 6,0 kg (97% de materia seca) de prepa-
30 ración de lipasa inmovilizada. La actividad de interesteri-

1 ficación discontinua era de 30,2% de P00, 6,9% de POP a la
1/2 hora, o bien 14,7% de P_{inc.}.

Experimento de aplicación nº 1.

5 4,0 g de la preparación de lipasa inmovilizada
se introdujeron en una columna con camisa de agua con un
diámetro interno de 1,5 cm. La temperatura en la columna
se mantuvo a 60°C. Un sustrato de aceite de oliva/ácido de
canoico con una composición de 2,5/1 (peso/peso) se bombeó
a través de una columna previa que contenía 30 g de Duolite
10 S 561 saturada con 21 ml de agua sometida a cambio de
iones, y después a través de la columna principal que con-
tenía la preparación de lipasa inmovilizada. El caudal se
controló para mantener la composición del producto de sali-
da en un valor correspondiente a una conversión de alrede-
15 dor de 65%, es decir 23% de D00 en el triglicérico final
(D00 significa un triglicérido con una unidad de ácido de-
canoico (en posición exterior) y dos unidades de ácido
oleico).

20 Suponiendo que la disminución de la actividad de
la lipasa inmovilizada sigue una reacción de primer orden,
la vida media o semiperíodo puede estimarse en 3200 horas.
Con una actividad inicial de 2,4 g de triglicérido/hora/g
de preparación de enzima, la productividad es aproximada-
mente 8,3 Ton. de triglicérido/kg de enzima, suponiendo un
25 tiempo de funcionamiento de dos semiperíodos. En la Fig. 1
se representa gráficamente el logaritmo del caudal en fun-
ción del tiempo.

Experimento de aplicación nº 2.

30 Se efectuó el mismo experimento que el nº 1, a
70°C en lugar de a 60°C.

1 Se encontró que la vida media o semiperíodo era
de 1300 horas y la actividad inicial de 2,3 g de triglicé-
rido/hora/g. de preparación de enzima, que corresponde a
5 una productividad de 3,2 toneladas de triglicérido/kg de
preparación de enzima. El logaritmo del caudal se represen-
ta gráficamente frente al tiempo en la fig. 2.

Ejemplo 14.

10 Este ejemplo ilustra el potencial de una prepara-
ción de lipasa inmovilizada producida según la invención,
para la interesterificación continua de una mezcla de tri-
glicéridos de alto punto de fusión compuesta de sebo de va-
ca y aceite de soja sin disolvente ni otros agentes auxi-
liares. Otros procedimientos similares pueden ser útiles
para la preparación de grasas especiales sin usar hidroge-
nación o interesterificación química, y adecuadas para mar-
15 garina o productos relacionados.

Inmovilización.

19,8 gramos de resina cambiadora de iones Duolite
A 561 húmeda (86,0% de materia seca), con más de 80% de
20 las partículas de un tamaño entre 400 y 850 micras, se ajus-
tó a pH 6,0 en suspensión acuosa y se lavaron con agua. Se
mezclaron con la resina 50 ml de lipasa de *Mucor miehei*
(7400 IU/ml, 8% de materia seca) y el pH se ajustó de nue-
vo a 6,0. Después de agitar durante 2 horas a temperatura
25 ambiente, filtrar y lavar con 2 x 50 ml de agua, la prepa-
ración se secó en vacío a temperatura ambiente. La produc-
ción fue de 19,2 gramos que contenían 8,5% de agua. La ac-
tividad que quedó en el filtrado era del 34% de la canti-
dad total inicial. La actividad de interesterificación dis-
30 continua era de 25,4% de P00, 6,0% de P00 a la 1/2 hora, o

1 bien 12,5% de P. inc.

Análisis de la reacción de interesterificación.

5 Se obtuvieron sebo blanco de vaca y aceite de soja reciente y refinado del mercado local. El sustrato se componía de 1,5 partes de sebo de vaca y 1 parte de aceite de soja, que se mezclaron a 70°C. Se añadió antioxidante BHT en una concentración de 0,1%. Para caracterizar los componentes individuales y seguir la reacción de interesterificación, se usó HPLC (cromatog. de líq. de alto rendimiento) para analizar la composición de triglicérido de los componentes del sustrato, la mezcla inicial y la mezcla interesterificada. Se efectuó una reacción discontinua inicial con 2,75 gramos de preparación de lipasa de *Mucor miehei* inmovilizada, 24 gramos de sebo, y 16 gramos de aceite de soja, durante 16,5 horas a 65°C. La HPLC mostró que la proporción de triglicérido de LPO a LLL (L: linoleico, P: palmítico, O: oleico) en la mezcla aumentó de 0,62 a 1,16, estando probablemente esta última cifra próxima a la proporción de equilibrio.

20 Propiedades de fusión de la mezcla interesterificada.

25 El cambio en las propiedades de fusión a causa de la interesterificación se analizó por dilatación según el método oficial de la IUPAC (IUPAC: Métodos estándar para el análisis de aceites, grasas y derivados, 6ª ed., método nº 2.141 (1979)). Los resultados se muestran en la tabla que sigue, con una mezcla correspondiente no interesterificada de sebo de vaca y aceite de soja (1,5:1) como referencia.

30

1	Temperatura, °C	0	20	25	30	35	40	45
	Dilatación, (microl/g de grasa)							
	Mezcla no inter- esterificada	30,8	22,9	18,7	14,6	11,2	6,5	1,6
5	Mezcla interes- terificada	16,5	4,9	4,9	3,1	0,6		

Ensayo en columna.

Un sistema de pequeña columna termoestabilizada se hizo funcionar durante 2 días para ilustrar un procedimiento continuo. 4,0 gramos de la preparación de lipasa inmovilizada descrita se colocaron en una columna. Se usó también una columna previa que contenía 5 gramos de resina Duolite A 561 húmeda (50% de materia seca). Se hizo pasar continuamente a través del sistema de columna, a 67°C, una mezcla de sebo de vaca/aceite de soja en la proporción de 1,5:1 en peso/peso. El rendimiento de la preparación de lipasa inmovilizada se muestra en la tabla que sigue:

Muestra/tiempo	Caudal, g de TG/h/ g de enzima	Composición LPO/LLL	Conversión %
20			
Sebo/aceite soja-sus- trato (18 h)	-	0,65	6 aprox.
Producto de 18 horas	2,10	0,90	52
Producto de 41 horas	1,63	0,93	54
Equil. (discont.)	-	1,16	100

Ejemplo 15.

Este ejemplo ilustra la aplicación de lipasa inmovilizada según la invención a la hidrólisis de grasas.

A una mezcla 1:1 de sebo de vaca puro y agua, 40 gramos de cada uno, se le añadió lipasa inmovilizada, pre-

1 parada como se ha descrito en el ejemplo 13, en una canti-
dad correspondiente a 100 LU/g de grasa, ó 0,13 gramos de
preparación de lipasa inmovilizada, suponiendo una carga
de 30.000 LU/g de lipasa inmovilizada. Se logró una mezcla
5 eficaz por agitación magnética a 48°C. El valor inicial de
pH de la fase acuosa se ajustó a 8,0. Al cabo de 4 días el
enzima se separó y la fase de grasa se analizó para deter-
minar el grado de hidrólisis (DH, abreviatura del inglés
"degrees of hydrolysis"). Se efectuaron ensayos por duplica-
10 do. El enzima inmovilizado recuperado se usó para un expe-
rimento 2', y se efectuó un experimento de comparación con
lipasa soluble, añadida también en una cantidad correspon-
diente a 100 LU/g de grasa. En este caso la fase acuosa se
usó para el experimento 2'. Se efectuaron tres ensayos con
15 la lipasa soluble.

Los resultados fueron los siguientes:

Preparación	Muestra nº	% de DH, 4 días, 48°C	
		Exp. 1'	Exp. 2'
Lipasa inmovilizada	1	30	31
	2	35	37
Lipasa soluble	1	61	5
	2	55	8
	3	46	7

25 El valor del pH descendió a alrededor de 6,8 con
la lipasa inmovilizada y a alrededor de 6,3 en el experi-
mento 1' y a alrededor de 7,4 en el experimento 2' con la
lipasa soluble. El % de DH se calculó dividiendo el índice
de acidez entre el índice de saponificación.

30

29094

1

Textos de las figuras

Fig. 1: Eje de ordenadas = g. de sustrato/hora
Eje de abscisas = horas

Fig. 2: Eje de ordenadas = g. de sustrato/hora
Eje de abscisas = horas.

5

10

15

20

25

30

29094

1

REIVINDICACIONES

5

Los puntos de invención propia y nueva que se presentan para que sean objeto de esta solicitud de patente de invención en España, por VEINTE años, son los que se recogen en las reivindicaciones siguientes:

10

1ª.- Un método para producir una preparación de lipasa inmovilizada destinada a la interesterificación de grasas, en el que una disolución acuosa de lipasa microbiana se pone en contacto con una resina cambiadora de aniones débil, en partículas y macroporosa, que contiene grupos amínicos primarios y/o secundarios y/o terciarios y que muestra un tamaño medio de partículas relativamente grande adecuado para el funcionamiento en una columna sin pérdida de carga excesiva, en condiciones en las que la lipasa está unida a la resina cambiadora de aniones, durante un período de tiempo suficiente para fijar la cantidad deseada de lipasa a la resina cambiadora de aniones, tras lo cual la lipasa inmovilizada así formada se separa de la fase acuosa y la lipasa inmovilizada separada se seca hasta un contenido de agua de entre alrededor de 2 y 40%.

15

20

2ª.- Un método según la reivindicación 1ª, en el que la lipasa es una lipasa termoestable.

25

3ª.- Un método según las reivindicaciones 1ª ó 2ª, en el que la lipasa microbiana se deriva de una especie de *Mucor termofilica*, especialmente *Mucor miehei*.

30

4ª.- Un método según las reivindicaciones 1ª a 3ª, en el que más del 90% de las partículas de la resina cambiadora de aniones débil macroporosa tiene un tamaño de

1 partículas de entre 100 y 1000 micras, y preferiblemente
entre alrededor de 200 y 400 micras.

5 5ª.- Un método según las reivindicaciones 1ª a
4ª, en el que la proporción entre la cantidad de disolu-
ción acuosa de la lipasa microbiana y el peso de resina
cambiadora de aniones débil corresponde a 5.000-50.000
LU/g de resina cambiadora de iones (peso en seco).

10 6ª.- Un método según la reivindicación 3ª, en el
que el pH durante el contacto entre la resina cambiadora
de iones y la disolución acuosa está entre 5 y 7.

7ª.- Un método según las reivindicaciones 1ª a
6ª, en el que el tiempo de contacto está entre 0,5 y 8 ho-
ras.

15 8ª.- Un método según las reivindicaciones 1ª a
7ª, en el que la separación se efectúa por simple filtra-
ción.

9ª.- Un método según las reivindicaciones 1ª a
8ª, en el que el secado se efectúa hasta un contenido de
agua de entre 5 y 20%.

20 10ª.- Un método según las reivindicaciones 1ª a
9ª, en el que la resina cambiadora de aniones débil, en
partículas y macroporosa se pone en contacto con una diso-
lución acuosa de un agente de reticulación, preferiblemen-
te una disolución acuosa de glutaraldehído, en una concen-
25 tración entre 0,1 y 1,0% en peso/peso, antes, durante o
después del contacto entre la resina cambiadora de aniones
débil en partículas y macroporosa y la disolución acuosa
de la lipasa microbiana, tras lo cual se separa la disolu-
ción que queda de agente de reticulación.

30 11ª.- "METODO PARA PRODUCIR UNA PREPARACION DE

1 LIPASA INMOVILIZADA DESTINADA A LA INTERESTERIFICACION DE
GRASAS".

Tal y como se ha descrito en la memoria que ante
cede, representado en los dibujos que se acompañan y para
5 los fines que se han especificado.

Esta memoria consta de treinta y ocho hojas es-
critas a máquina por una sola cara.

Madrid,

10

P.A.

15

20

25

29094

F C M

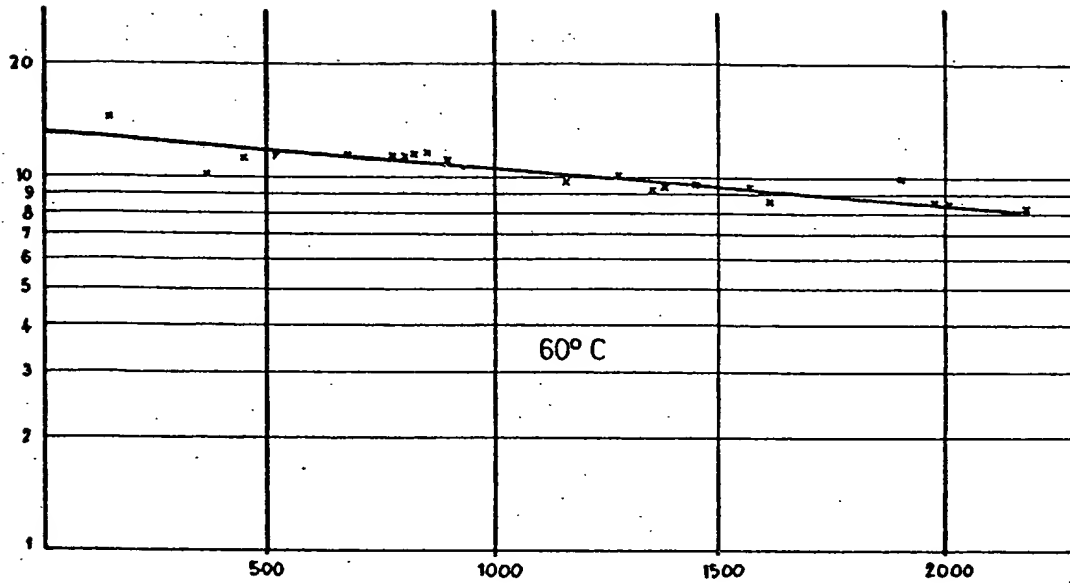


FIG-1

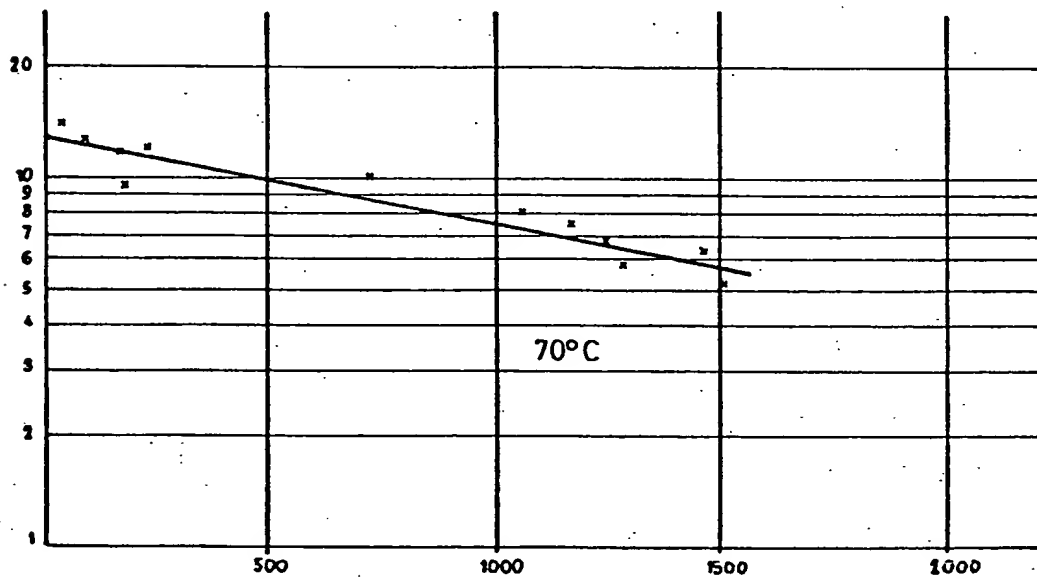


FIG-2

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☒ **BLACK BORDERS**

☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**

☒ **FADED TEXT OR DRAWING**

☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**

☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**

☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**

☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**

☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**

☒ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**

☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.